

Evaluación de la capacidad de biodegradación de diésel y de factores de virulencia en dos cepas bacterianas hidrocarburoclásticas

Tulia Ximena González Martínez

Universidad del Valle, Calle 13 No 100-00, Cali, Colombia.
correo electrónico: tulia.gonzalez@correounivalle.edu.co

Neyla Benítez Campo

Universidad del Valle, Calle 13 No 100-00, Cali, Colombia
correo electrónico: neyla.benitez@correounivalle.edu.co

RESUMEN

El uso de bacterias degradadoras de petróleo, conocidas como hidrocarburoclásticas, ha venido en aumento, sin embargo, no basta con una alta capacidad biodegradativa, sino que adicionalmente posean baja patogenicidad para ser utilizadas en procesos de biorremediación. Con el propósito de evaluar la capacidad de biodegradación de diésel y algunos factores de virulencia presentes en cepas autóctonas de *Acinetobacter* sp. DC-84 y *P. aeruginosa* DC-95, se determinó la tolerancia al diésel por concentración mínima inhibitoria (CMI), posteriormente se evaluó el porcentaje de degradación de fracciones de n-alcenos C15-C20 y C22, al cabo de 21 días, con inóculos individuales y en cultivo mixto, mediante bioensayos en medio mínimo de sales (MMS) al 5% de diésel, usando cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS). Como factores de virulencia se evaluó la movilidad *swarming*, *swimming* y *twitching*, biopelículas, esporas, cápsula y producción de piocianina. *Acinetobacter* sp., degradó el 100% de las fracciones de n-alcenos C16, C18-C20, y el 60, 74 y 24% para C15, C17 y C22 respectivamente. Contrariamente, *P. aeruginosa* incrementó las fracciones de C16-C20, C15 y C22 en un 9, 40 y 80% respectivamente. El cultivo mixto degradó el 12% de las fracciones de C20. Los factores de patogenicidad fueron muy bajos en *Acinetobacter* sp., encontrándose en *P. aeruginosa* un comportamiento ligeramente mayor al control para la movilidad *swimming* y *twitching* únicamente. Demostrándose un alto potencial biorremediador de *Acinetobacter* sp. DC-84 con muy baja patogenicidad, convirtiéndola en un microorganismo promisorio para la biorremediación de ambientes afectados por hidrocarburos del diésel.

Palabras claves: *Acinetobacter* sp., cromatografía de gases-espectrofotometría de masas, factores de virulencia, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The use of oil-eating bacteria, known as hydrocarbonoclasticus has been increasing, however, it is not enough to have a high biodegradation capacity, but a low pathogenicity is needed additionally to be used in bioremediation processes. With the aim of assessing the biodegradation capacity of diesel and some virulence factors present in native strains of *Acinetobacter* sp. DC-84 and *P. aeruginosa* DC-95, the diesel tolerance was determined by minimum inhibitory concentration (MIC), subsequently, the n-alkane fractions C15-C20 and C22 degradation percentage was assessed after 21 days, with individual inoculum and in mixed culture, through bioassays in minimal salt medium (MSM) with 5% of diesel, using gas chromatography connected to mass spectrophotometry (GC-MS). The *swarming*, *swimming* and *twitching* mobility, biolayers, spores, capsules and pyocyanin production were evaluated as virulence factors. *Acinetobacter* sp. degraded 100% of the n-alkane fractions C16, C18-C20, and 60%, 74% and 24% for C15, C17 and C22, respectively. On the contrary, *P. aeruginosa* increased the C16-C20, C15 and C22 fractions by 9, 40 and 80%, respectively. The mixed culture degraded the C20 fractions by 12%. The pathogenicity factors were very low in *Acinetobacter* sp., finding in *P.*

aeruginosa a slightly greater behavior only for *swimming* and *twitching* mobility than in the control. A high bioremediation potential in *Acinetobacter* sp. DC-84 with low pathogenicity was shown, turning it into a promissory microorganism for remediation in environments affected by diesel hydrocarbons.

Key words: Acinetobacter sp., gas chromatography-mass spectrometry, virulence factors, Pseudomonas aeruginosa

INTRODUCCIÓN

Dentro de la economía global el petróleo tiene un alto valor estratégico, lo que lo convierte en la materia prima más transportada en el mundo. A partir de él se obtienen fuentes de energía útil como lo son los combustibles, entre los cuales encontramos el diésel. Este es un hidrocarburo líquido que se obtiene por destilación del petróleo crudo y es utilizado para motores tanto de equipos pesados como automóviles (Trujillo, 2010). Tiene una composición química no definida en la que predominan cadenas de n-alcanos entre 11 y 22 átomos de carbono además de alquenos y aromáticos (Hernández, 2016).

A pesar de las mejoras que se han introducido y de la normativa cada vez

más estricta que regula las operaciones del transporte de petroleros, es indudable la continua producción de derrames de hidrocarburos en el mar y en ambientes terrestres, generando un gran daño medio ambiental (Silos, 2008). Además, las actividades antropogénicas industriales, ataques violentos y escorrentías municipales han causado también la contaminación con hidrocarburos en suelos, aguas superficiales, subterráneas y oceánicas (Varjani, 2017).

En Colombia se han evidenciado diferentes actividades que traen como consecuencia los derrames de hidrocarburos y, por consiguiente, altos costos humanos y ecológicos al afectar los recursos hídricos como la biodiversidad y las condiciones de vida de habitantes de

diferentes municipalidades (Benavides *et al.*, 2006). Según el ministerio de Defensa Nacional de Colombia, desde el año 2000 se han producido más de setecientas explosiones de oleoductos en zonas fronterizas que tienen como objetivo debilitar al Estado al atacar sus recursos energéticos por parte de las FARC y del ELN, produciendo la casi totalidad de los agravios a la infraestructura petrolera y generado la contaminación de seis mil hectáreas de ciénagas en setenta municipios del país.

Algunos de los casos más recientes se registraron en el año 2015 y 2018, en donde el oleoducto trasandino en Tumaco (Nariño) sufrió un atentado por parte de las FARC, derramándose 14.000 barriles de petróleo crudo que alcanzaron a llegar al océano Pacífico (Palacios, 2015). También, el 18 de Agosto de 2018 se registró una fuga de diésel en Puerto Nuevo, generado por el hundimiento de

una draga en el río Magdalena, afectando el servicio de agua potable en Barranquilla y alrededores (Agencia EFE and Colprensa, 2018). Así mismo, el 2 de marzo del mismo año se registró el derramamiento de 550 barriles de crudo en las quebradas La Lizama, Caño Muerto y el río Sogamoso, afectando 6.001 árboles y 2.442 animales (Pardo, 2018). El caso más actual se registró el pasado 13 de febrero, en donde el oleoducto Caño Limón-Coveñas (Norte de Santander) fue atacado por el ELN provocando el derrame de crudo al río Catatumbo (Rodríguez, 2019).

Teniendo en cuenta que el petróleo es una mezcla muy compleja y altamente tóxica, se ha generado una gran preocupación ambiental, ya que su potencial de bioacumulación y actividad carcinogénica son altos, siendo estos compuestos, quizás, los primeros en ser reconocidos como carcinógenos ambientales (Haritash and Kaushik, 2009). Los compuestos del

petróleo traen efectos en la población que impactan en los atributos ambientales referidos a factor de aire, agua, suelo, ecosistemas, además del entorno socioeconómico y cultural. Otros impactos sobre las poblaciones son aquellos vinculados a la salud y formas de vida que provocan alteraciones de tipo físico, biológico y psíquico (Mamani, Suárez and García, 2003). Ejemplo de estas alteraciones son el mal funcionamiento de los pulmones, daños al sistema nervioso, riñón e hígado, además de enfermedades transmisibles (Castillo, 2005). Varjani (2017), reportó algunos de los efectos causados en la vida silvestre por los contaminantes derivados del petróleo, entre los cuales se destacan retraso del crecimiento, asfixia, alteraciones en las reacciones metabólicas, desequilibrio hormonal, entre otros.

Debido a la importancia del uso del petróleo y sus derivados, surge la

preocupación por remediar los efectos adversos que genera esta actividad e intentar mantener la calidad del medio ambiente (Rosales, 2008). Para ello se hace necesario implementar tecnologías de remediación, las cuales implican una serie de operaciones que alteran la composición de una sustancia peligrosa o contaminante, a través de acciones químicas, físicas o biológicas, de manera que se reduzca la toxicidad, volumen o movilidad del contaminante (Zhu, Venosa and Suidan, 2004). No obstante, estas técnicas pueden no remover el contaminante en su totalidad, además de ser muy costosas (Sheppard *et al.*, 2014).

En contraste, los mecanismos de remediación biológicos son una alternativa para transformar estos compuestos en otros menos tóxicos, pero con menor inversión de recursos químicos financieros y de energía (Ward and Singh, 2003), siendo las bacterias las más empleadas en

este proceso (Cruz-Guzmán, 2007). Esta actividad de biorremediación puede llevarse a cabo mediante un solo microorganismo o varios de ellos, que cuando realizan procesos en conjunto, se denominan consorcio. Los consorcios se refieren a comunidades microbianas que en conjunto son capaces de colonizar determinados ecosistemas, en donde todas las comunidades se benefician de las demás (Rodríguez *et al.*, 2005). En los casos de derrame de petróleo y sus derivados, la biorremediación es reconocida como una técnica altamente eficiente y amigable con el ambiente, la cual tiene una alta aceptación pública por ser implementada fácilmente en los sitios contaminados (Vidali, 2001). Varios autores coinciden en las capacidades que poseen algunos microorganismos de los géneros *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. para degradar compuestos del petróleo y sus derivados (Benavides *et al.*, 2006;

Guermouche *et al.*, 2015; Grisales and Benitez, 2017).

Sin embargo, es importante considerar que los microorganismos a emplear en biorremediación no sean patógenos para otros organismos. En este sentido, se han descrito dos tipos básicos: los primarios, son aquellos que tienen patogenicidad, pero no todos los organismos pertenecientes a una especie patógena hacen el mismo daño, y los oportunistas, que son aquellos que causan enfermedad solo en los individuos que están comprometidos, ya sea en su defensa inmune, humoral o innata. (Rocha, Lozano and Martínez, 2004).

Romero, (2007), describe tres mecanismos generales de patogenicidad de los microorganismos: adhesividad, invasividad y toxigenicidad. Estas propiedades se encuentran codificadas en los genes y son regulados por señales ambientales. Algunas características de

bacterias patógenas están dadas por la producción de toxinas, estimulación directa de citocinas y la inducción de reacciones inmunopatológicas, además de la presencia de cápsulas que facilitan la transmisión de la enfermedad mediante la prevención de la desecación de los patógenos encapsulados. Es por esta razón que el conocimiento de los mecanismos responsables de la patogenicidad bacteriana es de máximo interés a la hora de la aplicación práctica (Rocha, Lozano and Martínez, 2004), como es el caso de la biorremediación.

Teniendo en cuenta la problemática anterior y como alternativa viable para contribuir en la remediación de suelos y aguas contaminadas, esta investigación pretende evaluar la capacidad de biodegradación de diésel y algunos factores de virulencia en dos cepas bacterianas individuales y en cultivo mixto.

MÉTODOS

Este estudio fue llevado a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM), del Departamento de Biología de la Universidad del Valle, sede Meléndez. Las cepas en estudio fueron aisladas previamente por Grisales y Benítez (2017), a partir de una muestra de suelo contaminada con petróleo crudo y crioconservadas a -20°C . Dichas cepas fueron preliminarmente identificadas como: *Acinetobacter baumannii* DC-84 y *Pseudomonas aeruginosa* DC-95.

Caracterización morfológica. Partiendo del crioconservado, las cepas fueron reactivadas por separado en caldo nutritivo y posteriormente sembradas en placas de agar Luria Bertani (LB), con incubación a 28°C por 24 h. Se realizaron observaciones macroscópicas como forma, borde, elevación, color de las colonias y observaciones microscópicas de las células

mediante tinción de Gram (Echeverry, Benitez and Mora, 2015).

Caracterización bioquímica. Con el propósito de confirmar la identificación, a partir de un cultivo fresco en agar LB de 24 h, se realizaron pruebas mediante el kit de identificación BBL Crystal *Enteric/Nonfermenter* (E/NF) *Identification* (ID), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante (Becton, Dickinson and Company.© BD), adicionalmente, se realizaron pruebas de motilidad, Indol, oxidasa, Voges-Proskauer y Rojo de Metilo en medio MR-VP (Echeverry, Benitez and Mora, 2015)

Caracterización molecular. Para la extracción de ADN genómico se utilizó el kit Invisorb® Spin Universal kit (Strattec molecular), siguiendo las indicaciones del fabricante y partiendo de un cultivo de 24 h de incubación a 37°C, en caldo LB. Con el resultado anterior, se realizó amplificación por PCR del gen del ADNr

16S, utilizando los cebadores universales 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; y 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. En un tubo Eppendorf se preparó la siguiente mezcla: 2 µL de ADN, 2,5 µL de buffer a 10X, 0,5 µL de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) a 10 mM, 1,25 µL de cada uno de los cebadores (F y R) a 10 mM, 2 µL de cloruro de magnesio (MgCl₂) a 25 mM, 0,2 µL de Taq ADN polimerasa y se ajustó con 15,3 µL de H₂O miliQ para un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción anterior se amplificó en un termociclador (Applied Biosystems™ Veriti Thermal Cycler) bajo las siguientes condiciones térmicas: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 40 ciclos trifásicos de 94°C, 50°C y 70°C por 1 min, 1 min y 2 min de duración respectivamente, terminando con un ciclo de 10 min a 72°C (Nikoh and Fukatsu, 1998). El producto de amplificación se

visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando GelRed y usando el marcador de peso de ADN Thermo Scientific GeneRuler.

La secuenciación fue realizada por la compañía Macrogen (Corea). Para corregir los errores generados en las secuencias obtenidas se utilizó el software Sequencher™ 4.1.4. Posteriormente fueron alineadas y comparadas mediante el programa informático Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Prueba de antagonismo. Se realizó una prueba de antagonismo entre las cepas *Acinetobacter* sp. DC-84, *P. aeruginosa* DC-95 y *Bacillus cereus* DC-81 para observar su crecimiento y asegurar la viabilidad del bioensayo a nivel de cultivo mixto. La siembra se realizó mediante rayados perpendiculares en agar Muller-Hinton (MH) y se incubó durante 24 h a 28°C.

Curvas de crecimiento. Para asegurar la buena calidad del inóculo para los bioensayos de remoción de hidrocarburos y las pruebas de patogenicidad, se determinó la fase exponencial tardía y el tiempo de incubación requerido por cada microorganismo, con este propósito se inocularon tubos de ensayo con 3 mL de caldo nutritivo, los cuales fueron incubados a 28°C y 130 rpm en incubadora Shaker (New Brunswick series I26) durante 24 h. Se tomaron mediciones de crecimiento bacteriano por D.O_{600nm} cada hora en espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, digital UV VIS).

Concentración mínima inhibitoria (CMI). Para evaluar la tolerancia de las cepas bacterianas al diésel y determinar el porcentaje a emplear en los bioensayos de remoción, se realizó la prueba CMI en tubos de ensayo con medio mínimo de sales MMS (60 mg/L Ca(NO₃)₂, 125 mg/L NaHCO₃, 70 mg/L KNO₃, 70 mg/L

NH₄Cl, 100 mg/L KH₂PO₄, 10 mg/L FeSO₄ x 7H₂O, 7 mg/L MnCl₂ x 2H₂O, 1,5 mg/L ZnSO₄) a concentraciones de diésel de 1, 2, 4, 6, 8 y 10%. Cada prueba se realizó por triplicado con un volumen final de 5 mL por tubo de ensayo e inoculados al 10% con cada cepa. Para asegurar la calidad del ensayo, se sembró un control positivo (con inóculo microbiano) y control negativo (sin inóculo microbiano) teniendo un total de 38 tubos de ensayo. Las concentraciones del hidrocarburo fueron preparadas a partir de una solución madre de diésel homogenizado con Tween 80 en proporciones iguales. Los tubos fueron incubados a 28°C durante 21 días. Pasado este tiempo, cada tubo fue sembrado en agar cuenta gérmenes (ACG) para corroborar el crecimiento (Grisales and Benitez, 2017)

Bioensayos de degradación de diésel.

Los bioensayos de degradación de diésel

se realizaron con las cepas *Acinetobacter* sp. DC-84, *P. aeruginosa* DC-95, descartando la cepa de *Bacillus cereus* DC-81, por presentar interacción negativa en las pruebas de antagonismo. La eficiencia de remoción del hidrocarburo a partir de cepas individuales se llevó a cabo en Erlenmeyers de 25 mL que contenían 2 mL de medio mínimo de sales (MMS) con diésel al 5% e inóculo bacteriano al 10% con cada una de las cepas de prueba. Las cepas fueron previamente cultivadas en 10 mL de caldo nutritivo durante 8-10 horas en Shaker a 130 rpm. Para asegurar el diésel como única fuente de carbono, la biomasa fue recuperada por centrifugación y lavada dos veces con MMS, para luego ser resuspendida en este mismo medio a una de D.O_{600nm} inicial de 0,9 (Grisales and Benitez, 2017).

Para determinar la degradación de diésel mediante el cultivo mixto, se llevó a cabo la misma metodología descrita, realizando

la inoculación a partir de un coctel bacteriano teniendo en cuenta el mismo porcentaje del inóculo microbiano por cada cepa. Los bioensayos de cada microorganismo constaron de cinco replicas y su control abiótico, los cuales fueron incubados a 28°C y 180 rpm durante 21 días, teniendo como variable de respuesta el porcentaje de degradación del hidrocarburo y como variable de control, el crecimiento bacteriano.

Para monitorear el crecimiento bacteriano se hicieron recuentos de microorganismos viables al inicio (T_0) y al final (T_{21}) del bioensayo, en agar nutritivo, pasadas 24 h de incubación a 28°C, utilizando el método de recuento estándar en placa. El resultado se expresó en unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) (Palittapongarnpim, Pokethitiyook and Upatham, 1998).

Extracción y análisis de degradación de diésel. Para extraer el hidrocarburo

presente en los Erlenmeyer de los bioensayos se utilizó acetato de etilo (EtOAc) como solvente, haciendo lavados para separar el hidrocarburo del MMS. El EtOAc obtenido se dejó evaporar y vuelto a suspender en 1.5 mL con el fin de concentrar las muestras, las cuales fueron almacenadas en viales de 2 mL y a -19°C hasta su lectura. Este proceso fue realizado en el T_0 y T_{21} . Para medir las concentraciones de las fracciones de n-alcanos C15, C16, C17, C18, C19, C20 y C22 se hizo uso de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrofotometría de masas GC-MS-QP2010 Ultra, marca SHIMADZU, en el laboratorio de Análisis Industriales del Departamento de Química de la Universidad del Valle. Se inyectó un volumen de 0,1 μ L de cada vial con las siguientes condiciones de funcionamiento: para la separación de los componentes se utilizó una columna capilar Rtx-5MS (30.0 μ m x 0.25 μ m x 0.25 μ m), a una

temperatura inicial de 40°C hasta alcanzar los 300°C, la temperatura del inyector y detector fueron 230°C y 280°C respectivamente. La concentración de hidrocarburo en las muestras fue identificada y cuantificada con un estándar de hidrocarburo C₃₀ resuspendido en hexano. Los hidrocarburos del diésel se calcularon como el porcentaje de hidrocarburo restante usando las concentraciones de los picos del cromatograma. Para calcular el porcentaje residual, se empleó la formula aplicada por Palittapongarnpim *et al.* (1998), en donde la concentración residual de las diferentes fracciones de n-alcanos del diésel de las muestras fueron comparadas con los respectivos controles abióticos. Finalmente, para calcular el porcentaje de degradación se empleó la fórmula utilizada en la literatura (Narváez Flórez, Gómez and Martínez, 2017).

Análisis estadístico. Para comparar la eficiencia de degradación de hidrocarburos efectuada por las cepas individuales y en cultivo mixto, se realizó un diseño de bloques completos al azar, en el cual se estableció el factor cepa con 4 niveles (dos cepas y dos controles) y el factor tiempo con dos niveles (0 y 21 días), en donde, la variable de respuesta correspondió al porcentaje de remoción y la variable de control fue el crecimiento bacteriano. La comparación de las medias de los tratamientos y de la significancia estadística de los efectos de los factores principales y de sus interacciones se estableció mediante análisis de varianza (ANOVA), empleando el software Prisma 8.0, con un nivel de significancia de $p < 0.05$

Pruebas de patogenicidad de las cepas. Con el propósito de evaluar la patogenicidad de las cepas en estudio y teniendo como referencia la cepa

Pseudomonas aeruginosa (PAO1), por su reconocida patogenicidad, se realizaron las siguientes pruebas características de estos microorganismos:

Movilidad *Swarming*, *Swimming* y *Twiching*. Para evaluar la movilidad dependiente de la estructura celular y del medio acuoso en el que se encuentra el microorganismo se empleó la metodología descrita por Filloux and Ramos, (no date) y Mulet *et al.* (2013). Se realizaron siembras por triplicado en medio *swarm*, *swim* y *twitch* Para la prueba *swarming* se preparó un inóculo en caldo LB a D.O_{600nm} 1.5, del cual se sembró un volumen de 1 μ L en el centro del agar y se incubó a 37°C por 18 horas en cámara húmeda. Para la prueba *swimming*, se introdujo un palillo estéril previamente humedecido con el inóculo fresco en caldo LB, hasta la mitad del grosor del agar y fue incubado a 37°C por 24 horas. La prueba *twiching* se realizó homogenizando una colonia fresca en agar

LB 1,5% e inoculando el centro de la caja hasta el fondo del agar con la ayuda de un palillo estéril. Se incubaron a 37°C durante 24 h. Las lecturas se realizaron promediando las medidas de la longitud de los enjambres, tomando la medida del halo de crecimiento radial y tomando el diámetro del halo visible observado en el fondo del agar, respectivamente.

Producción de piocianina. Para determinar la producción de piocianina se llevó a cabo el protocolo descrito por Mulet *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. Se prepararon los inóculos en 7,5 mL de caldo Ácido Casaminos al 2% (54g/L de K₂HPO₄, 0,25 g/L MgSO₄.7H₂O), fueron incubados a 37°C y 130 rpm durante 40 h. luego se centrifugó y se dispensaron 150 μ L del sobrenadante en una placa de 96 pozos fondo plano con seis réplicas por cada muestra. La lectura de piocianina se realizó en un lector de

microplacas iMark™ 10824, a una longitud de onda 530 nm.

Formación de biopelículas. La evaluación de formación de biopelículas se realizó siguiendo la metodología descrita por Merritt, Kadouri and O'Toole, (2005) con algunas modificaciones. De un cultivo fresco en agar LB se suspendió una colonia en 5 mL de caldo LB y se incubó a 37°C y 130 rpm hasta haber alcanzado una $D.O_{600nm}$ inicial de $0,05 \pm 0,01$. Se dispensaron 100 μ L del inóculo en una microplaca de 96 pozos fondo cónico con seis replicas por cada cepa, teniendo como control negativo caldo LB sin inóculo y como control positivo la cepa PAO1. La microplaca fue incubada a 37°C por 48 h. Luego se realizó el lavado adicionando agua destilada a cada pozo para luego descartarla y repetir el proceso tres veces. Después se hizo la coloración con cristal violeta y homogenización con ácido acético al 30%. Se dispensaron 125 μ L por

cada pozo en una placa de 96 pozos fondo plano y fue leída en un espectrofotómetro AccuReader 960 con software M965 Mate, a 550 nm. Las interpretaciones de los resultados se dieron en una escala cualitativa según Stepanovic *et al.*, (2000).

Presencia de cápsulas. Se realizaron observación de cápsulas polisacáridas mediante el método de Duguid o tinción negativa en donde se suspendió una muestra de cultivo sobre un portaobjeto con una gota de tinta china y se procedió a observar al microscopio (Pumarola *et al.*, no date).

Presencia de esporas. Para la observación de esporas se realizó la técnica de Shaeffer-Fulton. Para ello se fijó un extendido de la cepa en un portaobjetos, se cubrió con verde malaquita y se calentó durante 10 min, luego se cubrió la preparación con safranina por 30 segundos y se lavó para su posterior observación microscópica (Rodríguez *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de las cepas bacterianas

Acinetobacter sp. DC-84, presentó colonias semicirculares, blancas grisáceas y tornasol a contraluz, lisas, de textura cerosa con bordes enteros y más claros que el centro de la colonia, tamaño aproximado de 6-8mm (Fig. 1a), sus formas celulares fueron cocobacilos Gram negativos, agrupados irregularmente e inmóviles (Fig. 1b). Por su parte, *P. aeruginosa* DC-95, presentó colonias planas con bordes enteros, un tamaño aproximado de 7-9 mm, coloración verde-amarillo tornasol en el centro de la colonia y bordes más claros, además de olor dulce (Fig. 1c). Su forma celular fue de bacilos Gram negativos, móviles y agrupados generalmente en cadenas cortas o en pareja (Fig. 1d).

A partir de las características bioquímicas analizadas, se observó que ambos

microorganismos carecen de la producción de indol y fermentación de glucosa, también se observó ausencia de la enzima citocromo oxidasa solo en *Acinetobacter* sp. DC-84. Mediante el kit de identificación BBL Crystal y las características morfológicas obtenidas se confirmó que las cepas en estudio eran pertenecientes a los géneros *baumannii* y *aeruginosa* (Tabla 1). Sin embargo, después de someter y comparar las secuencias obtenidas con los registros existentes en la base de datos genéticos del GenBank mediante la plataforma BLAST, se comprobó la identidad de la cepa *P. aeruginosa*, mientras que *A. baumannii* DC-84 solo tuvo correlación hasta el género *Acinetobacter* sp., por lo cual fue nombrada en este estudio como *Acinetobacter* sp. DC-84. Las secuencias pueden ser consultadas con el número de accesión MK840990 para *Acinetobacter*

sp. y MK840991 para *P. aeruginosa* DC-95

Prueba de antagonismo

Pasado el tiempo de incubación, se observó la inhibición de crecimiento de la cepa *B. cereus* DC-81 frente a *P. aeruginosa* DC-95. Razón por la cual se decidió no realizar los bioensayos con dicha cepa y trabajar únicamente con *Acinetobacter* sp. DC-84 y *P. aeruginosa* DC-95, las cuales no presentaron alteraciones en su crecimiento al estar juntas (Figura 2).

Degradación de n-alcenos por *Acinetobacter* sp., *P. aeruginosa* y en cultivo mixto

Los resultados de los bioensayos realizados con *Acinetobacter* sp. DC-84, *P. aeruginosa* DC95 y el cultivo mixto, mostraron que para la cepa *Acinetobacter* sp. DC-84 el porcentaje de degradación fue del 100% para fracciones alifáticas de C16, C18, C19 y C20, mientras que, para

fracciones de C15, C17 y C22 la degradación fue del 60, 75 y 24% respectivamente. Por el contrario, *P. aeruginosa* DC-95 presentó un incremento no superior al 9% en la concentración de las fracciones alifáticas de C16 a C20, mientras que para C15 y C22 el incremento fue de 40 y 80% respectivamente. Este mismo comportamiento se evidencio en el cultivo mixto, siendo un poco menor el incremento del porcentaje para C22 (76%) en comparación con *P. aeruginosa* DC-95. Por último, se observó un porcentaje de degradación del 12% para las fracciones alifáticas de C20 por parte del cultivo mixto (Fig. 3). Dichos resultados muestran que únicamente la cepa *Acinetobacter* sp. DC-84 tiende a degradar eficientemente los hidrocarburos del diésel con carbonos entre C15 a C20, encontrándose diferencias significativas solo entre la degradación realizada por *Acinetobacter*

sp. DC-84 en contraste con *P. aeruginosa* y el cultivo mixto (ANOVA; $p < 0,0001$) (Tabla 2).

En cuanto al crecimiento bacteriano al cabo de los 21 días, se observó que, *Acinetobacter* sp. DC-84, aumentó ligeramente, pasando de $1,2 \times 10^7$ a $6,2 \times 10^7$ UFC/mL, mientras que *P. aeruginosa* DC-95, permaneció constante, con un crecimiento de $1,4 \times 10^8$ UFC/mL, en cuanto al cultivo mixto se apreció una ligera disminución del crecimiento que inició con $6,8 \times 10^8$ UFC/mL y finalizó con $2,1 \times 10^7$ UFC/mL (Fig. 4)

Pruebas de patogenicidad

P. aeruginosa DC-95, presentó longitudes del halo de crecimiento radial ligeramente mayores a la cepa de referencia PAO1, mostrando un resultado positivo en las movilidades *swimming* y *twitching*, pero sin movilidad *swarming*. Por su parte *Acinetobacter* sp. DC-84, mostró un

comportamiento negativo en los tres tipos de movilidad (Tabla 3).

En cuanto a la producción de piocianina, solo *P. aeruginosa* DC-95 presentó producción de este pigmento con un promedio de absorbancia $D.O_{530nm} = 0,280$, valor mucho menor al de la PAO1. Por su parte, la prueba de formación de biopelículas para ambas cepas fue menor que la cepa de referencia, mostrando *Acinetobacter* sp. DC-84 mayor formación que *P. aeruginosa*. De igual manera en las cepas evaluadas, tampoco se observó presencia de cápsulas ni de esporas (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* pertenecientes al orden *Pseudomonadales*, son organismos que se distribuyen ampliamente en la naturaleza siendo el agua y suelo sus principales nichos

ecológicos, además de ser aislados de diferentes fuentes como alimentos y flora microbiana de la piel (Salazar and Nieves, 2005; INSeHT, 2016). *A. baumannii* pertenece a la familia *Moraxellaceae* y hace parte de las 33 genopecies del género *Acinetobacter* y de la cual se han definido 19 biotipos. El grupo *A. baumannii* junto con otros tres conforman el complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* debido a sus características bioquímicas tan similares (Gerner-Smidt, 1992; Vanegas, Roncancio and Jimenez, 2014). Posible razón por la cual, al corroborar la identidad de las cepas basándose en el estudio de sus secuencias genéticas, *A. baumannii* DC-84 no tubo correlación con la especie *baumannii* sino solo con el género *Acinetobacter*. Este género se distingue fenotípicamente por estar conformado por cocobacilos Gram negativos, sin flagelo, oxidasa negativos, no fermentadores ni formadores de esporas

(Koneman and Allen, 2008). Por su parte, *P. aeruginosa* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es conocido también como un bacilo Gram negativo, móvil, gracias a flagelos polares, y oxidasa positivo, no formador de esporas y en algunos casos productor de cápsula polisacárida (Martinez, 2007). Estas características fueron similares a las descritas para las cepas de este estudio (Tabla 1).

En este estudio se pudo apreciar la eficiencia de *Acinetobacter* sp. DC-84 en la degradación de fracciones de n-alcanos de C15 a C20, presentes en el diésel (Fig. 3), lo cual refleja su importante capacidad para degradar compuestos orgánicos de los ambientes donde se encuentra, usando un vasto número de compuestos alifáticos (Juni, 1978). Estos resultados fueron similares a los reportados por (Martins *et al.*, 2016), quienes mencionan que, una posible característica que le confiere esta

habilidad degradadora es la producción de biosurfactantes que aumentan la biodisponibilidad de los productos insolubles en agua y así poder ser fácilmente degradados (Pucci *et al.*, 2010). Se ha reportado que varias cepas de *Acinetobacter* tienen preferencia por la degradación de los alcanos C10-C30, debido a que poseen genes para esta función, dioxigenasas e hidroxilasas (Aliakbari *et al.*, 2014; Shaieb, Elghazawani and Issa, 2015).

Por otra parte, *P. aeruginosa* DC-95 mostró un incremento en la concentración de las fracciones de n-alcanos, lo que pudo deberse a su gran capacidad de catabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos característica que generalmente está codificada en plásmidos (Pérez *et al.*, 2008; Pucci, Acuña and Pucci, 2015), convirtiendo hidrocarburos complejos en compuestos más sencillos, incrementando de esta manera la

concentración de C15 y C22. Lozano, (2005) y Mayz and Manzi, (2017) mencionan la intervención de *Pseudomonas* en la degradación de hidrocarburos aromáticos, ejemplo de ello es la degradación de tolueno y naftaleno en un 66 y 70% respectivamente, realizada por una cepa de *Pseudomonas* en suelos contaminados con hidrocarburos, al cabo de 42 días. Cabe resaltar que, la diferencia en la estructura de los hidrocarburos y la longitud de las cadenas requieren diferentes enzimas degradantes, así como también, el agotamiento del oxígeno disuelto en el medio, a medida que la población bacteriana aumenta, estas podrían ser algunas de las causas de la degradación incompleta (Martins *et al.*, 2016) y del aumento de las fracciones de n-alcanos de cadenas inferiores a C22.

Los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* son de gran interés en la biodegradación de xenobióticos siendo su actividad de

degradación complementaria, puesto que la degradación de los aromáticos por *Pseudomonas* va ligado en algunos casos a los metabolitos producidos por *Acinetobacter*, al degradar alcanos. Es por esta razón, que *Acinetobacter* es un microorganismo ideal para la formación de consorcios de degradación de hidrocarburos, ya que mientras descompone un gran número de alcanos, produce bioemulsificantes que ayudan a las demás cepas del consorcio a tener acceso a los hidrocarburos (Braibant, 2004), comportamiento que pudo haber sido el observado en la degradación de las fracciones alifáticas de C20, situación que se evidenció también en los resultados obtenidos con el cultivo mixto.

En cuanto al crecimiento celular, el incremento en *Acinetobacter* sp. DC-84 puede explicarse debido a la capacidad que tiene este grupo de microorganismos para adaptarse a ambientes contaminados

incluso en poco tiempo (21 días). Sin embargo, el agotamiento de nutrientes básicos para la multiplicación celular, puede ser un factor determinante para limitar dicho crecimiento (Deng *et al.*, 2014), lo que genera que la población microbiana permanezca casi constante al producirse un crecimiento lento pero a su vez, la muerte de algunas células sin afectar las funciones metabólicas (Madigan, Martinko and Parker, 2009). Situación que pudo ser la observada en *P. aeruginosa* DC-95. En el caso del cultivo mixto se observó una disminución de células al finalizar el experimento (Fig. 4), esto pudo ser consecuencia de los biosurfactantes producidos por *P. aeruginosa* DC-95 como posible sustancia antagonista para ganar ventaja competitiva sobre *Acinetobacter* sp. DC-84 (Riojas *et al.*, 2010).

Por otro lado, a pesar de que *Acinetobacter* es considerado un agente poco patógeno,

existen características que le permiten aumentar su virulencia entre las cuales está la formación de cápsula que inhibe la fagocitosis, el desarrollo de biopelículas sobre las superficies y células humanas, que contribuyen a mejorar su resistencia microbiana (Rada Cuentas, 2016) y como patógeno ambiental, la capacidad de metabolizar diferentes fuentes de energía (Zuñiga *et al.*, 2010). En la tabla 3 se observa que esta cepa presentó formación de biopelículas, pero cabe resaltar que no superó la capacidad presentada por la cepa de referencia PAO1, al igual que *P. aeruginosa* DC.85, siendo esta última la menor formadora de biopelículas.

Por su parte, *P. aeruginosa* posee adicionalmente otros factores de patogenicidad como lo es la producción de pigmentos que son difundidos en el medio, característica propia de bacterias pancromóforas. La piocianina puede pertenecer a diferentes grupos químicos y

aunque su función es poco conocida, algunos autores mencionan que va ligada a la respiración (Pumarola *et al.*, no date), además de actuar como sideróforo ayudando a la captación de hierro (Martinez, 2007) e inhibiendo la formación de organismos competidores al tener la capacidad de oxidar y reducir otras moléculas, característica que le permite dañar células pulmonares de mamíferos con fibrosis quística (Justo *et al.*, 2014). En este estudio se observó que ambas cepas presentaron producción de dicho pigmento, pero en concentraciones por debajo a las presentadas por la PAO1, siendo *Acinetobacter* sp. DC-84 la menor productora de piocianina (Tabla 3)

La movilidad bacteriana, también es otra característica que se observó solo en la cepa *P. aeruginosa* DC-95, siendo el fenómeno *swimming* y *twitching* los presentes (Tabla 3). Estos tipos de desplazamiento son dependientes de

flagelos que permiten un movimiento desorganizado del microorganismo en medio líquido (*swimming*) y mediante la extensión y retracción de pilis en superficie (*twitching*). Posible razón por la cual no se observaron estos tipos de movilidad en *Acinetobacter* sp. DC-84 al carecer de flagelo. Según Hacker *et al.*, (1997) el desplazamiento tipo *twitching* es característico en *P. aeruginosa* y depende de las fimbrias tipo IV, que permiten la adhesión e infección de la bacteria a las células huésped (Whitchurch, Alm and Mattick, 2002). En general, los desplazamientos tipo *swimming* y *twitching* pueden garantizar la supervivencia de células bacterianas ya que son capaces de dirigir su movimiento dependiendo de factores como oxígeno, luz, nutrientes, gradientes químicos, huir de sustancias tóxicas, o colonizar hospederos, estableciendo asociaciones patogénicas (Bernabéu, 2014). Por otra parte, en el

desplazamiento *swarming* intervienen modificaciones morfológicas (producción de flagelos laterales y aumento de tamaño celular), como también la producción de biosurfactantes que permiten romper la tensión superficial y generar el movimiento en ambientes semisólidos (Dávila, 2007). En este trabajo no se reveló el desplazamiento tipo *swarming* para ninguna de las dos cepas, lo que les otorga un menor grado de virulencia.

A pesar de que algunos autores han reportado la presencia de cápsulas polisacáridas para estos géneros (Rodriguez *et al.*, no date; Fraga, 2018), la no expresión de esta estructura en las cepas estudiadas pudo deberse a las diferentes condiciones de crecimiento bacteriano bajo situaciones de estrés, ya que la expresión de los genes en las bacterias también es regulado mediante la adaptación a las condiciones ambientales (Betancor, Gadea and Flores, 2006).

Teniendo en cuenta que las principales manifestaciones de las infecciones producidas por las cepas estudiadas corresponden a infecciones nosocomiales, cobrando notoria importancia por su incidencia en las infecciones causadas especialmente en personas hospitalizadas en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Guido *et al.*, 2013) y, aunque *Acinetobacter* sp. DC-84 presentó la menor expresión de factores de virulencia en comparación con *P. aeruginosa* DC-95, cabe resaltar que el mayor determinante del potencial patogénico de ambas cepas está dado por el estado de salud del huésped (Montero, 2012), situación que se evitará en casos de manipulación de estos microorganismos al ser utilizados en procesos de biorremediación, que requieren el uso de técnicas de bioseguridad adecuadas.

Los resultados encontrados durante esta investigación demuestran que

Acinetobacter sp. DC-84 es una bacteria con alto potencial biorremediador de los hidrocarburos del petróleo presentes en el diésel, debido a su capacidad de degradar fracciones de alcanos de cadenas entre 15 a 22 átomos de carbono, con muy baja patogenicidad, características que la convierten en un microorganismo promisorio para la rehabilitación de ambientes afectados por este tipo de hidrocarburos. Además, se concibe la posibilidad de indagar más acerca de la capacidad de degradación de hidrocarburos de estructuras complejas por parte de *P. aeruginosa* y en cultivo mixto, especialmente los presentes en el diésel.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Hipólito Isaza, del Departamento de Química por su asesoría en los análisis de hidrocarburos. A los biólogos Sonia Gutiérrez, Alejandra Echeverry, Diego Hernández y Nelson

Rivera por la ayuda en el trabajo de Castillo, F. (2005) 'Biotransformación', in Tebar, E. (ed.) *Biotecnología Ambiental*, p. 510.

laboratorio. Al personal de los laboratorios Cruz-Guzmán, M. (2007) 'Introducción a la contaminación medioambiental: plaguicidas, metales pesados y técnicas de remediación con arcillas y organoarcillas', in Sevilla, U. de (ed.) *La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales*, p. 96. Available at: https://books.google.com.co/books?id=KPCJItVcQRoC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

de docencia de los departamentos de Biología y Química.

LITERATURA CITADA

- Agencia EFE and Colprensa (2018) 'Derrame de Dávila, combustible en el río Magdalena deja sin servicio de agua a Barranquilla', *El País*. Available at: <https://www.elpais.com.co/colombia/derrame-de-combustible-en-el-rio-magdalena-deja-sin-servicio-de-agua-a-barranquilla.html>.
- Aliakbari, E. *et al.* (2014) 'Degradation of Alkanes in contaminated sites', *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(5), pp. 1620–1637.
- Benavides, J. *et al.* (2006) 'Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo', 4(5), pp. 82–90.
- Bernabéu, L. M. (2014) *Bases moleculares que gobiernan la movilidad swarming de sinorhizobium meliloti: conexión con formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis*. Available at: <http://digibug.ugr.es/handle/10481/34147>.
- Betancor, L., Gadea, M. and Flores, K. (2006) 'Genética Bacteriana', in *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, pp. 59–80. doi: 10.1089/jam.1996.9.215.
- Braibant, C. (2004) 'Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados', *Instituto Ecnológico De Costa Rica*, p. 47. doi: 10.1039/b705094a.
- A. (2007) *Participación de las moléculas señal acilo homoserina lactona, en la movilidad swarming en Vibrio spp, aislada de raíces de mangle negro Avicennia germinans*. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C.
- Deng, M.-C. *et al.* (2014) 'Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the', *journal published by Elsevier*. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.04.018.
- Echeverry, A., Benitez, N. and Mora, A. (2015) *CARACTERIZACION DE LA CEPA NATIVA Comamonas SP. ARD-A3 Y EVALUACION DEL POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE CROMO*. Universidad del Valle.
- Filloux, A. and Ramos, J.-L. (no date) *Pseudomonas Methods and Protocols*.
- Fraga, L. Á. (2018) 'Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*'. Gerner-Smidt, P. (1992) 'Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex.', *Journal of clinical microbiology*, 30(10), pp. 2680–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383266%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC270498>.
- Grisales, M. and Benitez, N. (2017)

*BIODEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS POR CEPAS
BACTERIANAS AISLADAS DE SUELO
CONTAMINADO CON PETRÓLEO EN
TUMACO, NARIÑO. Universidad del
Valle.*

- Guermouche, A. *et al.* (2015) 'Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n -alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons', pp. 15332–15346. doi: 10.1007/s11356-015-4343-8.
- Guido, C. *et al.* (2013) 'Ciencias Clínicas Y Patológicas', *Revista Cubana de Medicina Militar*, 42(3), pp. 368–376. Available at: <http://scielo.sld.cu>.
- Hacker, J. *et al.* (1997) 'Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution', *Molecular Microbiology*, 23(6), pp. 1089–1097. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x.
- Haritash, A. K. and Kaushik, C. P. (2009) 'Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review', 169, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137.
- Hernández, N. D. (2016) "“Establecimiento de un proceso de biorremediación usando *Stenotrophomonas maltophilia*”".
- INSeHT (2016) 'Pseudomona aeruginosa', *DATABio*, 1, p. 5.
- Juni, E. (1978) 'Genetics and Physiology of *Acinetobacter*', *Juni, E.*, 32(1), pp. 349–371. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.32.100178.002025>.
- Justo, S. *et al.* (2014) 'Efecto antibiótico de Piocianina de', *Revista de Ciencias*, X, pp. 127–133.
- Koneman, E. and Allen, S. (2008) 'Bacilos Gramnegativos no fermentadores', in Panamericana, E. M. (ed.) *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*, pp. 337–339. Available at: <https://books.google.com.co/books?id=jyVQueKro88C&pg=PR4&dq=koneman+et+a1+2006&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjCt6K7q-XhAhWlxVkJHVHEBiMQ6AEIMjAB#v=onepage&q=a.baumannii&f=false>.
- Lozano, N. (2005) 'Biorremediación de ambientes contaminados con petróleo', *TecnoGestion, Una mirada al ambiente*, II(I), pp. 51–55.
- Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. (2009) 'Brock. Biología de los microorganismos', in *Brock. Biología de los microorganismos*.
- Mamani, W., Suárez, N. and García, C. (2003) 'Contaminación por actividad hidrocarbúrfica', in *Contaminación del agua e impactos por actividad hidrocarbúrfica en la Serranía de Guadalupe*, pp. 17–25.
- Martínez, L. (2007) 'Pseudomonas aeruginosa: APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE SU ESTRUCTURA Y AL DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS LÍDIA RUIZ MARTÍNEZ Barcelona, Noviembre 2007'. Available at: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf.
- Martins, B. *et al.* (2016) 'Isolation , identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach , Malaysia', *MPB. Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.060.
- Mayz, J. C. and Manzi, L. V. (2017) 'Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr.', *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), pp. 29–37. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408.
- Merritt, J., Kadouri, D. and O'Toole, J. (2005) 'Growing and Analyzing Static Biofilms', *Curr Protoc Microbiol.*, pp. 1–29. doi:

- 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.Growing.
- Montero, M. M. (2012) 'Pseudomonas aeruginosa multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos (Tesis Doctoral)', p. 109. Available at: <http://hdl.handle.net/10803/107902>.
- Mulet, X. *et al.* (2013) 'Biological Markers of Pseudomonas aeruginosa Epidemic High-Risk Clones', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), pp. 5527–5535. doi: 10.1128/aac.01481-13.
- Narváez Flórez, S., Gómez, M. L. and Martínez, M. (2017) 'Selección De Bacterias Con Capacidad Degradadora De Hidrocarburos Aisladas a Partir De Sedimentos Del Caribe Colombiano', *Bulletin of Marine and Coastal Research*, 37(1), pp. 63–77. doi: 10.25268/bimc.invemar.2008.37.1.182.
- Nikoh, N. and Fukatsu, T. (1998) 'Two Intracellular Symbiotic Bacteria from the Mulberry Psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera)', *Applied and environmental microbiology*, 64(10), pp. 3599–3606.
- Palacios, M. (2015) *Colombia - Informe Final MIRA: Derrame de crudo en ríos Mira y Caunapi Tumaco (Nariño) 01 / 07 / 2015 Ubicación de la zona visitada Colombia - Informe Final MIRA: Derrame de crudo en ríos Mira y Caunapi Tumaco (Nariño) 01 / 07 / 2015 Actualización a*. Available at: https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/assessments/151029_actualizacion_informe_final_atentados_rios_caunapi_y_mira.pdf.
- Palittapongarnpim, M., Pokethitiyook, P. and Upatham, E. S. (1998) 'Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic', (167272), pp. 83–90.
- Pardo, T. (2018) 'En Colombia se han derramado 3,7 millones de barriles de crudo', *El Tiempo*. Available at: <https://www.eltiempo.com/vida/medio-ambiente/cifras-de-derrames-de-crudo-en-colombia-en-los-ultimos-anos-207664>.
- Pérez, R. *et al.* (2008) 'Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelo contaminados con petróleo'.
- Pucci, G. *et al.* (2010) 'Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina Diversity of culturable bacteria capable of degrading hydrocarbons from', 17(2), pp. 237–244.
- Pucci, G., Acuña, A. and Pucci, O. (2015) 'Biodegradación de hidrocarburos en fondos de tanques de la industria petrolera', 22(April), pp. 97–101.
- Pumarola, A. *et al.* (no date) *Microbiología y parasitología médica*.
- Rada Cuentas, J. (2016) 'Artículo de revisión', 55(1), pp. 29–48.
- Riojas, H. *et al.* (2010) 'Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos'.
- Rocha, R., Lozano, P. and Martínez, Y. (2004) 'Bases moleculares de la patogenicidad microbiana', in BUAP (ed.) *Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero*, pp. 1–20. Available at: https://books.google.com.co/books?id=aEIwbI7zHAYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Rodríguez, D. *et al.* (no date) 'Infectología Revisión de Tema *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente', *revista de los estudiantes de medicina de la universidad industrial de santander*. doi: 10.18273/revmed.v29n2-2016010.
- Rodríguez, E. *et al.* (2005) 'Actividad desinfectante', in Rica, E. U. de C. (ed.) *Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio*, pp. 402–403. Available at: <https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=vwB0fgirgN0C&oi=fnd&pg=PR>

- R15&ots=xZthz1sewd&sig=TFok8hh3RgRddQyVKT9I2AgB3HI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- Rodríguez, M. A. (2019) 'Atentan contra oleoducto Caño Limón Coveñas en Norte de Santander', *El Tiempo*. Available at: <https://www.eltiempo.com/colombia/otras-ciudades/atentan-contraleoducto-cano-limon-covenas-en-norte-de-santander-349534>.
- Romero, R. (2007) 'Patogenicidad bacteriana', in Stepanovic, S. *et al.* (2000) 'A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation', *Journal of microbiological methods*, 40, pp. 175–179.
- Trujillo, R. F. (2010) 'Características de los principales productos comerciales derivados de los hidrocarburos', in Ediciones, E. (ed.) *Hidrocarburos. Manejo seguro*, p. 31. doi: 9587712013, 9789587712018.
- Vanegas, J., Roncancio, G. and Jimenez, J. (2014) 'Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico', (2), pp. 233–246.
- Varjani, S. J. (2017) 'Microbial degradation of petroleum hydrocarbons', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 223, pp. 277–286. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.037.
- Vidali, M. (2001) 'Bioremediation . An overview *', 73(7), pp. 1163–1172.
- Ward, O. and Singh, Æ. A. (2003) 'Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste', pp. 260–270. doi: 10.1007/s10295-003-0042-4.
- Whitchurch, C. B., Alm, R. A. and Mattick, J. S. (2002) 'The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in Pseudomonas aeruginosa.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), pp. 9839–9843. doi: 10.1073/pnas.93.18.9839.
- Zhu, X., Venosa, A. D. and Suidan, M. T. (2004) 'Literature Review on the Use of Commercial Bioremediation Agents for Cleanup of Oil-Contaminated Estuarine
- Silos, J. M. (2008) 'Los hidrocarburos y sus propiedades', in Cádiz, S. de P. de la U. de (ed.) *Manual de lucha contra la contaminación con hidrocarburos*. España, pp. 27–41. Available at: https://books.google.com.co/books?id=kU90SzZc_TAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Rosales, L. (2008) *BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON ACEITE USADO DE AUTOMÓVIL CON EL HONGO DE LA PUDRICIÓN BLANCA Pleurotus ostreatus (SETAS) EN DURANGO*. doi: Tesis de Ingeniería Civil.
- Salazar, E. and Nieves, B. (2005) 'Acinetobacter spp. : Aspectos microbiológicos , clínicos y epidemiológicos'.
- Shaieb, F. M., Elghazawani, A. H. and Issa, A. (2015) 'Original Research Article Studies on crude oil degrading Bacteria isolated from Libyan desert', 4(2), pp. 920–927.
- Sheppard, P. J. *et al.* (2014) 'The application of a carrier-based bioremediation strategy for marine oil spills', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 84(1–2), pp. 339–346. doi:

Environments', *Epa/600/R-04/075*, (July),
p. 61.
Zuñiga, A. *et al.* (2010) 'Relación entre virulencia

y resistencia antimicrobiana en
Acinetobacter baumannii', 8(14), pp. 148–
162.

Tabla 1. Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas hidrocarburocláticas *Acinetobacter* sp. DC-84 y *P. aeruginosa* DC-95.

CARACTERISTICA	RESULTADO	
	<i>Acinetobacter</i> sp. DC-84	<i>P. aeruginosa</i> DC-95
Morfología celular	Cocobacilo	Bacilo
Gram	-	-
Motilidad	-	+
Adonitol	-	-
Ácido malónico	+	-
Arabinosa	+	-
Arginina	+	+
Cloruro de trifeniltetrazolio	-	-
Esculina	-	-
Galactosa	+	-
Glicina	-	+
Hidrólisis de Urea	+	+
Indol	-	-
Inositol	-	-
Lisina	+	+
Manitol	-	-
Manosa	+	+
Melibiosa	+	-
Oxidasa	-	+
p -n-p-fosfato	-	+
p-nitro-DL-fenilalanina	-	-
p-n-p bisfosfato	-	-
p-n-p- α -arabinósido	-	-
p-n-p- β -galactósido	-	-
p-n-p- β -glucorónido	-	-
p-n-p-fosforilcolina	-	+
p-n-p-N-acetil glucosamidina	-	-
p-n-p-xilósido	-	-
p-n-p- α - β -glucósido	-	-
Prolina nitroanilida	-	+
Ramnosa	-	-
Reduccion de citrato	+	+
Rojo de Metilo	-	-
Sacarosa	-	-
Sorbitol	-	-
Voges Proskauer	-	-
γ -L-glutamil p-nitroanilida	-	+
Perfil BBL crystal (ID)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza para las concentraciones finales de la degradación de n-alcanos por *Acinetobacter* sp. DC-84, *P. aeruginosa* DC-95 y el cultivo mixto

ANOVA	SS	DF	MS	F(DFn, DFd)	P value
Treatment	46307	2	23154	F(2,18)=22,06	P<0.0001
Residual	18889	18	1049		
Total	65196	20			

Tabla 3. Pruebas de patogenicidad realizadas a *P. aeruginosa* DC-95 y *Acinetobacter* sp. DC-84, en contraste con la cepa de referencia PAO1.

Prueba	Unidad	<i>P. aeruginosa</i> DC-95	<i>Acinetobacter</i> sp. DC-84	Referencia PAO1
Movilidad				
<i>Swarming</i>	mm	7,3	6,0	73,0
<i>Swimming</i>	mm	63,0	0,0	61,0
<i>Twitching</i>	mm	32,0	0,0	26,0
Producción de piocianina	Absorbancia (530nm)	0,280	0,088	0,329
Formación de biopelículas	Absorbancia (550nm)	0,68	1,0	1,31
Presencia de cápsulas		-	-	+
Presencia de esporas		-	-	-

(-) Resultado negativo y (+) Resultado positivo

Figura 1. Observaciones macro y microscópicas (100X) de *Acinetobacter* sp.DC-84 (a y b) y *Pseudomonas aeruginosa* DC-95 (c y d).

Figura 2. Prueba de antagonismo entre las cepas *Acinetobacter* sp. DC-84 (A), *Pseudomonas aeruginosa* DC-95 (P) y *Bacillus cereus* DC-81 (B), donde se observa que existe dominancia de *P. aeruginosa* sobre *B. cereus* inhibiendo su crecimiento.

Figura 3. Degradación de las fracciones de los n-alcanos C15 - C20 y C22 por las cepas bacterianas *Acinetobacter* sp. DC-84, *P. aeruginosa* DC-95 y en cultivo mixto

Figura 4. Crecimiento de las cepas *Acinetobacter* sp. DC-84, *P.aeruginosa* DC-95 y el cultivo mixto, durante el bioensayo de degradación de hidrocarburos del diésel







